FR

Anti-HCMV rec. IgG ELISA

ELISA pour la détection d'anticorps IgG Anti-cytomégalo-virus dans du sérum et du plasma humain

Conditionnement

REF [4] 807 031 96 tests IVD coffret de tests complets

Usage prévu

Les infections par le cytomégalovirus humain (HCMV), virus de la famille des ß-herpes, sont répandues dans le monde entier (taux de prévalence 40 - 100 %). Alors qu'une infection par le HCMV est asymptomatique chez la majorité des personnes immunocompétentes, elle peut conduire à de graves complications chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli ou ne s'est pas encore totalement développé (hépatite, rétinite, pneumonie, etc.). HCMV est l'organisme pathogène le plus fréquent des infections congénitales. Approximativement 10 % des enfants infectés congénitalement par HCMV présentent des symptômes à la naissance (ictère, hépatosplénomégalie, hémorragies pétéchiales et choriorétinite). Les receveurs de greffes d'organes et de moelle osseuse et les patients atteints du SIDA constituent d'autres groupes de patients pour lesquels une infection aiguë par HCMV est très grave. Grâce à des tests sérologiques, il est possible de différencier une infection par le CMV d'une infection par l'EBV ou par un toxoplasme.

Principe de la méthode - ELISA classique -

Le test Anti-HCMV recombinant (rec.) IgG ELISA de Bio-Rad est un titrage immuno-enzymatique indirect avec antigène adsorbé (ELISA) pour le diagnostic *in vitro* IVD qui utilise deux protéines de fusion autologues très purifiées, CG1 et CG2 pour détecter des anticorps IgG spécifiques (2). Si l'échantillon testé contient des anticorps spécifiques, ils se lieront à l'antigène recombinant dans les puits de la microplaque. Les anticorps non-spécifiques sont éliminés par une étape de lavage. Le complexe anticorps-antigène formé est détecté en utilisant un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre l'IgG humaine, marqué par une enzyme. La présence d'anticorps liés est mise en évidence à l'aide d'une réaction enzymatique, donnant un produit coloré, en utilisant la TMB (3,3´5,5´-tétraméthylbenzidine) comme substrat. La réaction enzymatique est arrêtée avec de l'acide sulfurique. Mesurer la densité optique à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (longueur d'onde de référence: 615-690 nm).

La trousse contient

MTP	1	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés par les antigènes recombinants CG1 + CG2 (concentration: > 0.5 µg/ml).
NC	1,2 ml	**Contrôle CMV IgG-négatif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
PC	1,2 ml	**Contrôle CMV IgG-positif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
STD	0,75 ml	**Etalon HCMV** (prêt à l'emploi, humain) La quantité d'unités, spécifique du lot, est imprimée sur l'étiquette
DIL	45 ml	**Diluant de l'échantillon** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,01 % de sulfate de néomycine, 0,03 % de chloramphénicol
CONJ	15 ml	**Conjugué d'anti-IgG humain** (prêt à l'emploi) Conservateur: 0,025% de pénicilline V, 0,025% de sulfate de streptomycine, 0,2% de Proclin-300.
WB	6 ml	**Tampon de lavage concentré** (500 x) conservateur: 0,01 % de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol
SUB	13 ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB)< 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	15 ml	**Solution d'arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	**Sachet de conservation:** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées.
FOL	1	**Feuilles transparentes auto-adhésives:** Feuilles transparentes auto-adhésives pour recouvrir les puits des microplaques pendant l'incubation.
	1	**Notice du corffet**

Conservateurs: concentration totale < 0,11%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques, incubateur pour les MTP ELISA. En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Avertissement et précautions

Ne pas incorporer de réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter tous les échantillons et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les contrôles sont négatifs pour anti-HIV 1/2, anti-HCV, HB_SAg, anti-syphilis et les transaminases élevées. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement toutes les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des
techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiquement contrôlées.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2-8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2-8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium avec un déshydratant et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées avec le déshydratant dans le sachet refermable et les conserver ainsi à 2-8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Préparation des réactifs

Diluer le tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (par exemple, diluer 2 ml à 1 litre). Le tampon ainsi préparé est stable pendant une semaine, conservé à 2-8°C. Tous les autres composants du test sont prêts à l'emploi. Tous les réactifs sont spécifiques d'un lot ; ne pas les utiliser avec des trousses d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma frais, sans hémolyse. Des échantillons de sérum ou de plasma à forte lipémie, ictériques ou à contamination microbienne et des préparations d'immunoglobuline concentrées risquent de donner des résultats de test non fiables. Eviter de congeler et décongeler les échantillons à plusieurs reprises. Si les échantillons doivent être transportés, les emballer conformément aux exigences réglementaires pour le transport de matières infectieuses. Ne pas inactiver les échantillons, car il pourrait se produire des réactions non-spécifiques.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage).

L'analyse qualitative des anticorps IgG peut être réalisée en utilisant au choix une méthode manuelle ou une méthode automatique (processeur ELISA) pour la réalisation des tests.

Dilution des échantillons au 1:21 avec prédilution dans des tubes

Diluer les contrôles PC, NC et les échantillons au 1:21 dans un tube (par exemple, 25 µl de contrôle ou d'échantillon + 500 µl de DIL). Bien mélanger.

Dilution des échantillons au 1:21 avec dilution directement dans la plaque

Pipeter 200 µl de DIL dans chaque puits. Cette dilution directement dans la microplaque convient tout particulièrement bien en cas d'utilisation de dispositifs de pipetage automatiques. Si la dilution est effectuée directement dans la plaque manuellement, il est important d'éviter la fixation non-spécifique de protéines en observant les étapes suivantes: Pipeter premièrement 200 µl de DIL dans le puits, puis ajouter 10 µl d'échantillon ou de témoins. Mélanger de 5 à 7 fois quand on ajoute les 10 µl d'échantillon ou de témoins.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

W1: laver 5 fois avec le tampon de lavage. Pour cela, éliminer le liquide du puits et distribuer 300 µl de tampon de lavage. Remplir le puits avec au moins 250 µl de tampon de lavage (volume total 550 µl). Répéter cette procédure de lavage 5 fois. Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Procédure de pipetage pour la détermination qualitative d'IgG (dilution en tube)

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1/B1	C1/ D1	E1/ F1	G1...
Blanc	200 DIL			
NC double test	--	200 NC	--	--
PC double test	--	--	200 PC	--
Echantillon 1:21	--	--	--	200
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 1 mn**, 37 ± 1°C	processeur*: **60 ± 1 mn**, 37 ± 1°C C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**Puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C	processeur*: **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
step 3	**well [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité	processeur *: **15 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15mn suivant l'arrêt, à 450nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence:615-690nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

CE 0197

BIO-RAD

187558/07 – 06/2010

Calcul de la détermination qualitative
Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), soustraire la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles et des échantillons. Extinction moyenne des blancs ≦ 0,100. Après soustraction du blanc, les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères de validité suivants:

DO moyenne de NC: ≦ 0,300 DO moyenne de PC: ≧0,600

Calcul de la valeur seuil et de la zone grise
La valeur seuil est calculée à partir de la DO moyenne des contrôles négatifs (NC $\overline{x}$) à laquelle on ajoute 0,300. Valeur seuil = NC $\overline{x}$ + 0,300. La zone grise s'étend entre la valeur seuil et la valeur seuil moins 10%.

Interprétation du résultat
Les échantillons ayant une valeur d'extinction inférieure à la zone grise sont considérés comme négatifs. Si un échantillon a une valeur d'extinction égale ou supérieure à la zone grise, il est considéré comme positif pour les anticorps IgG spécifiques de HCMV. Si la valeur de DO de l'échantillon retesté est dans la zone grise (résultat douteux), nous recommandons de demander un nouveau prélèvement.

Détermination quantitative des échantillons HCMV-IgG positifs
On peut réaliser un dosage quantitatif des anticorps IgG spécifiques d'HCMV en utilisant une des méthodes d'incubation suivantes:

Procédure de pipetage pour la détermination quantitative d'IgG

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi

La réactivité de l'étalon de HCMV a été déterminée comparativement à l'étalon du Paul-Ehrlich Institut (PEI) et présente une légère variabilité en fonction du lot. Selon la plage de mesure du photomètre spectral, il faut prédiluer l'étalon de HCMV dans DIL comme suit:

a) plage de mesure de DO 0 - 3,0 (par exemple: lecteur Anthos II): préparer des prédilutions contenant 20/ 10/ 5/ 2,5 et 1,25 U/ml.
b) plage de mesure de DO 0 - 4,0 (par exemple: processeur ELISA III de Behring) préparer des prédilutions contenant 30/15/ 7,5/3,75 et 1,88U/ml.

Les étalons prédilués et tous les échantillons sont dilués au 1:168 (1:21 + 1:8) en utilisant le diluant de l'échantillon. Bien mélanger. Pipeter 200 µl de dilutions des étalons et d'échantillons ainsi dilués ainsi que des contrôles positifs et négatifs dilués au 1:21 selon le schéma suivant:

étape 1	**Puits [µl]**			
	A1/B1	C1/ D1	E1/ F1	G1/H1
Blanc	200 DIL			
NC double test 1:21	--	200 NC	--	--
PC double test 1:21	--	--	200 PC	--
STD dilution 1:168 20 U/ ml (a) ou 30 U/ml (b)	--	--	--	200
	A2/B2	C2/ D2	E2/ F2	G2/H2
STD dilution 1:168 10 U/ml (a) ou 15 U/ml (b)	200	--	--	--
STD dilution 1:168 5 U/ml (a) ou 7,5 U/ml (b)	--	200	--	--
STD dilution 1:168 2,5 U/ml (a) ou 3,75 U/ml (b)	--	--	200	--
STD dilution 1:168 1,25 U/ml (a) ou 1,88 U/ml (b)	--	--	--	200
Echantillons à quantifier	à partir de A3 200			
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C	Processeur*: **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**Puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C	Processeur*: **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**Puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité	Processeur*: **15 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615-690nm).				

*** voir le schéma de pipetage pour la détection qualitative d'IgG**

Calcul de la détermination quantitative
Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), on retranche la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles, de STD et des échantillons. L'extinction moyenne des blancs, DO, ne doit pas dépasser 0,100. La valeur moyenne de DO de NC doit être ≦ 0,300 et celle de PC doit être ≧ 0,600. On calcule les valeurs moyennes des DO des standards dilués et on trace la courbe donnant ces valeurs en fonction des concentrations d'IgG correspondantes en unités/ml sur un papier semi-logarithmique (en reliant les points entre eux). Les concentrations d'IgG dans les échantillons peuvent être déterminées par lecture des valeurs sur la courbe d'étalonnage. On peut aussi déterminer la courbe d'étalonnage et les concentrations des échantillons en utilisant un logiciel de lecteur de microplaques moderne (par exemple Anthos HTII). L'opérateur doit valider le lecteur sous sa propre responsabilité.
Les valeurs inférieures à la courbe d'étalonnage sont définies par U/ml < 1,25 (Anthos HTII) or U/ml < 1,88 (BEP III). Les échantillons donnant des valeurs supérieures à la courbe d'étalonnage doivent être dilués et mesurés à nouveau. Pour que la quantification soit correcte, il faut que les valeurs de DO soient dans l'intervalle de la courbe d'étalonnage.

Limitations de la méthode
La détection d'anticorps est une méthode indirecte de détection d'un organisme pathogène. Les résultats négatifs obtenus avec le test Anti-HCMV IgG ELISA n'excluent pas une implication du HCMV dans la maladie. Par ailleurs, un résultat positif n'est pas suffisant pour définir la maladie. La connaissance précise des autres informations cliniques et des antécédents du patient est indispensable pour une interprétation correcte. Les méthodes directes suivantes complètent le diagnostic sérologique d'HCMV: dosage de l'antigènémie, PCR et culture du virus.

Performance
Trois cent deux échantillons de donneurs de sang sains ont été testés comparativement à un test ELISA de référence basé sur des antigènes dérivés de culture cellulaire. Le test IgG ELISA a présenté une sensibilité de 100 % et une spécificité de 99,03%. Cinquante-cinq échantillons de sérum/plasma avec EDTA/plasma avec citrate ont été testés, dans chaque cas à partir du même donneur. Les résultats obtenus étaient en accord pour tous les échantillons. La variabilité intra-série du test Anti-HCMV recombinant IgG ELISA a été étudiée en pipetant un échantillon très réactif et un échantillon peu réactif dans 45 puits d'une plaque. Par cette procédure, on a obtenu le coefficient de variation (CV) suivant: échantillon très réactif (7,2%), échantillon peu réactif (13,4 %). La variabilité inter-séries a été évaluée en testant un échantillon dans sept séries successives sur plusieurs jours. Un CV de 9,2% a été obtenu. Le test Anti-HCMV recombinant IgG ELISA a été évalué sur 55 échantillons risquant de donner lieu à une réaction croisée: EBV (35), VZV (9), HSV (2), ANA (4), RF (5). Aucun de ces échantillons n'a donné de résultat positif.

Littérature

1. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. Vornhagen, R. et coll. *J. Clinical Microbiology*, 32, 981-986 (1994).
2. Construction of recombinant autologous fusion proteins which enables IgG-specific serodiagnosis of past HCMV-infection. Vornhagen, R. et coll. *Biotest Bull*. 5, 221-227 (1995).
3. Screening of blood donors for human cytomegalovirus (HCMV) IgG antibody with an enzyme immunoassay using recombinant antigens. Weber, B. et coll. *Journal of Clinical Virology* 14, 173-181 (1999).
4. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.

Guide de dépannage
1) Taux élevé, et inattendu, de résultats réactifs. Des échantillons ou des contrôles ont été pipetés avant le pipetage de DIL ou bien le mélange a été insuffisant.
2) Valeur moyenne du blanc supérieure au critère de validité, DO ≧ 0,100:
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage: Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Utiliser le WB de Bio-Rad contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde: une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
3) Coloration jaune dans tous les puits: (voir 2a, 2b)
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage
   b) DIL ou CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
4) Valeur de DO moyenne de PC inférieure à ≦ 0,600:
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage: lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC ou 3b.
5) Valeur de DO moyenne de NC supérieure à ≧ 0,300: (voir 1 et 2 a-d)
   a) NC n'a pas été pipeté après le pipetage des échantillons ; pipeter tous les échantillons avant de pipeter les blancs et les contrôles.
   b) Contamination par le couvercle du PC

Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany
Tel.: +49-6103-801-95, Fax: +49-6103-801-724
www.bio-rad.com, techsupport.bmd@bio-rad.com

CE 0197

187558/07 – 06/2010